

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 10 月 22 日(22.10.2015)

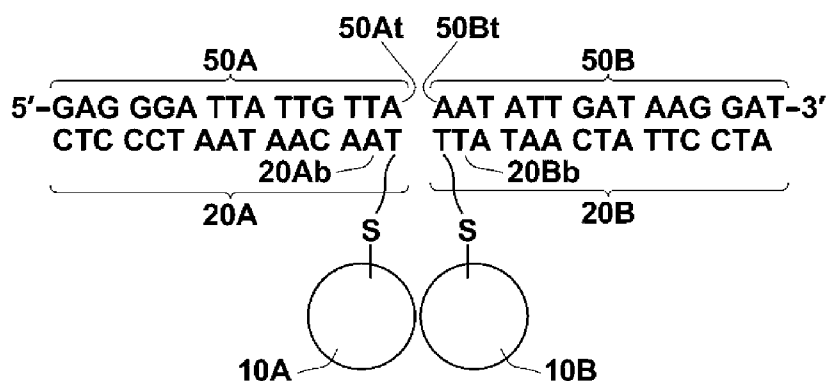


(10) 国際公開番号
WO 2015/159535 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 27/447* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
G01N 21/21 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 21/47 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/002062
- (22) 国際出願日: 2015 年 4 月 14 日(14.04.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-084249 2014 年 4 月 16 日(16.04.2014) JP
- (71) 出願人: 富士フイルム株式会社(FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布 2 丁目 2 6 番 3 0 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 大塚 尚(OHTSUKA, Hisashi); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島 5 7 7 番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 斎木 敏治(SAIKI, Toshiharu); 〒2238521 神奈川県横浜市港北区日吉 3 丁目 1 4 番 1 号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 江刺家 恵子(ESASHIKA, Keiko); 〒2238521 神奈川県横浜市港北区日吉 3 丁目 1 4 番 1 号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 柳田 征史, 外(YANAGIDA, Masashi et al.); 〒2220033 神奈川県横浜市港北区新横浜 3 - 1 8 - 3 新横浜 K S ビル 7 階 柳田国際特許事務所 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: DETECTION SOLUTION, METHOD FOR PREPARING SAME, AND BIOSENSING METHOD

(54) 発明の名称: 検出液とその調製方法、バイオセンシング方法



(57) Abstract: [Problem] To improve detection accuracy in biosensing using precious metal nanoparticles as a marker. [Solution] This detection solution (1) is made by dispersing first nanoparticle probes (P1) and second nanoparticle probes (P2) in a buffer aqueous solution (40). Each first nanoparticle probe (P1) is made by fixing, to the surface of a first precious metal nanoparticle (10A), a first probe (20A) including a biological substance that specifically binds to a first section (50A) of a substance to be detected (50). Each second nanoparticle probe (P2) is made by fixing, to the surface of a second precious metal nanoparticle (10B), a second probe (20B) including a biological substance that specifically binds to a second section (50B) of the substance to be detected (50). The first probe (20A) and the second probe (20B) are fixed to the first precious metal nanoparticle (10A) and the second precious metal nanoparticle (10B), respectively, such that the respective base ends (20Ab (20Bb)) of the first probe (20A) and the second probe (20B) specifically bind, respectively, to the respective leading ends (50At (50Bt)) of the first section (50A) and the second section (50B) on the side where the two section are proximal to one another.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2015/159535 A1



【課題】 貴金属ナノ粒子を標識としたバイオセンシングにおいて検出精度を高める。 【解決手段】 検出液（１）は、被検出物質（５０）の第１の部位（５０Ａ）と特異結合する生体物質を含む第１のプローブ（２０Ａ）が第１の貴金属ナノ粒子（１０Ａ）の表面に固定されてなる第１のナノ粒子プローブ（Ｐ１）と、被検出物質（５０）の第２の部位（５０Ｂ）と特異結合する生体物質を含む第２のプローブ（２０Ｂ）が第２の貴金属ナノ粒子（１０Ｂ）の表面に固定されてなる第２のナノ粒子プローブ（Ｐ２）とが緩衝性水溶液（４０）に分散されてなり、第１の部位（５０Ａ）及び第２の部位（５０Ｂ）の、部位同士が近接する側の先端（５０Ａｔ（５０Ｂｔ））と、第１のプローブ（２０Ａ）及び第２のプローブ（２０Ｂ）の基端（２０Ａｂ（２０Ｂｂ））とが特異結合するように、第１のプローブ（２０Ａ）と第２のプローブ（２０Ｂ）がそれぞれ、第１の貴金属ナノ粒子（１０Ａ）と第２の貴金属ナノ粒子（１０Ｂ）に固定されてなる。

明 細 書

発明の名称： 検出液とその調製方法、バイオセンシング方法

技術分野

[0001] 本発明は、貴金属ナノ粒子を用いたバイオセンシングに使用する検出液とその調製方法、更に、その検出液を用いたバイオセンシング方法に関する。

背景技術

[0002] バイオセンシングは、生体物質の特異的な結合（特異結合）を、光学的又は電気的な信号の変化を用いて検出することにより行われている。光学的な信号の変化を検出するバイオセンシングには、蛍光物質や貴金属ナノ粒子等を標識として用い、DNAやRNA、ペプチド核酸、オリゴヌクレオチド等の遺伝物質を検出する方法等がある。

[0003] 蛍光物質による標識は、被検出物質（例えば、ターゲット遺伝子）濃度が低い場合に信号が弱く、高感度検出が困難である。表面増強ラマン（SERS）などの増幅を用いる方法により高感度検出が可能であるが、多くの増幅過程を必要とするとともに、偶然性にも支配されるため、バラツキが大きく、医療診断のような定量測定には不向きである。

[0004] 1990年代後半より、特定の配列を有する核酸断片（オリゴヌクレオチド）を検出するバイオセンシングにおいて、一本鎖の核酸同士の塩基配列が相補的（特異的）である場合に、相補性を持つ塩基対間の水素結合により二本鎖核酸を形成するハイブリダイゼーション法の標識として、貴金属ナノ粒子を用いる方法が精力的に検討されている（特許文献1～2、非特許文献1～4）。かかる方法では、検出する核酸断片と相補鎖を形成する生体物質を表面にブラシ状に担持した貴金属ナノ粒子をプローブとして用いている。

[0005] 例えば、特許文献1、特許文献2には、核酸の配列の一部と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着した金ナノ粒子をプローブとして用い、このオリゴヌクレオチドが核酸に対してハイブリダイズした結果、金ナノ粒子の局在プラズモン共鳴波長が長波長シフトして得られる金ナノ粒子の呈色

の変化を検出する遺伝子診断法が記載されている。

[0006] しかしながら、これらの方法も、目視による検出であるため検出感度は蛍光法と同等であり検出限界は数十 nM レベルにとどまっている。

[0007] 貴金属ナノ粒子を用いたハイブリダイゼーションの有無の検出には、M i r k i n らにより進められてきた架橋型凝集反応系と、非特許文献 1 の筆者である M a e d a らが進めてきた非架橋型凝集反応系とがある。非特許文献 1 には、非架橋型凝集反応系において、高濃度の塩 (N a C l) 添加することにより荷電反発を抑制して凝集を迅速化すること、また、検出感度を高めるために、表面プラズモン共鳴センサーを用いる方法が記載されている。

[0008] 更に、M a e d a らは、非特許文献 2 において、非特許文献 1 に記載の高濃度の塩添加系において、凝集プロセスの迅速化と簡易化、そして貴金属粒子との結合部と反対側の末端基におけるミスマッチを、高感度検出のために、金ナノ粒子のサイズ、ターゲット遺伝子の種類、緩衝水溶液の p H 等のファクターを個々に最適化する必要があることを述べている。

[0009] 非特許文献 3 では、検出感度向上を目的とし、動的光散乱 (D L S) 法により金ナノ粒子の粒子径を測定することにより、ハイブリダイゼーションの有無、すなわち、ターゲット遺伝子の有無を光学的に検出する方法を提唱している。これは、ターゲット遺伝子が存在する場合、ハイブリダイゼーションにより、その相補鎖を持つ 2 つの金ナノ粒子が結合し、見かけの粒子径が大きくなることを利用したものであり、著者らは、数 p M の検出が可能であると主張している。

[0010] 非特許文献 4 には、非架橋型凝集反応系において、粒子径の小さな金ナノ粒子の光散乱を感度良く検出可能とするために、共鳴光散乱相関分光 (RLSCS) 法を用いる方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献 1 : 特表 2 0 0 4 - 5 1 5 2 0 8 号公報

特許文献 2 : 特許 4 3 4 7 0 4 9 号公報

非特許文献

[0012] 非特許文献1：佐藤保信、前田瑞夫、「DNA担持ナノ粒子による遺伝子診断」、ぶんせき、2008年9月号、p. 468-471

非特許文献2：Kae Sato et al., 「Rapid Aggregation of Gold Nanoparticles Induced by Non-Cross-Linking DNA Hybridization. 」, J. AM. CHEM. SOC. 2003, 125, p.8102-8103.

非特許文献3：Qiu Dai et al., 「A One-Step Highly Sensitive Method for DNA Detection Using Dynamic Light Scattering. 」, J. AM. CHEM. SOC. 2008, 130, p.8138-8139.

非特許文献4：Kanglin Wang et al., 「Single-Molecule Technology for Rapid Detection of DNA Hybridization Based on Resonance Light Scattering of Gold Nanoparticles. 」, ChemBioChem 2007, 8, p.1126-1129.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 上記貴金属ナノ粒子を標識としたバイオセンシングにおいて、塩基数の比較的多いターゲット遺伝子の検出には、複数のプローブを用いたハイブリダイゼーションにより1つのターゲット遺伝子を検出する方法が好適である。しかしながら、検出したいターゲット遺伝子の長さ（塩基数）は、一般に一定ではなく、上記特許文献及び非特許文献に記載のいずれの方法を適用しても、図10（特許文献2の図40）に示されるように、ターゲット遺伝子の種類によって、金ナノ粒子の間隔が異なり、塩基数の多いものについては、ハイブリダイズしても、標識となる金ナノ粒子同士が離れてしまう。例えば、金ナノ粒子径 $\phi = 30 \text{ nm}$ に対しターゲットDNAが30塩基（約10 nm）と短い場合は、ハイブリダイゼーションした2つの金ナノ粒子を「一体化した粒子」となるが、通常のウィルスのような長いターゲット遺伝子などを測定する場合、ハイブリダイゼーションした場合にも単独の2つの粒子となる。

[0014] また、遺伝物質の構造は強固ではないため、測定中に捻れたり、折れ曲が

ってしまうため、同じターゲット遺伝子を用いた場合でも、金ナノ粒子の間隔は一定となりにくい。

[0015] 従って、金ナノ粒子の間隔の違いにより測定結果が異なるため、上記特許文献及び非特許文献 1, 2 の方法では凝集反応による色の変化があいまいであり、また、非特許文献 3, 4 の方法でも高い測定精度が得られない。非特許文献 2 では、高濃度の塩添加系においてターゲット遺伝子の種類によって最適化することが記載されているが、高濃度の塩添加系では、凝集の迅速化がなされる一方で、分散性の低下、それに伴う非特異結合による凝集が生じやすく検出感度は低いものになってしまう。

[0016] また、アガロースゲル等を用いてゲル電気泳動でハイブリダイゼーションの有無を検出する方法においても同様で、同じ 2 量体においても見かけの粒子サイズが異なってしまうため、ゲルマトリックス中での移動度に差が生じバンド間の区別が不明瞭となる。

[0017] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、貴金属ナノ粒子を標識として、被測定試料中に含まれる、生体物質からなる被検出物質を検出するバイオセンシングにおいて、検出感度及び精度の良好なバイオセンシング方法、及びそれを可能にする検出液を提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0018] 本発明の検出液は、貴金属ナノ粒子を標識として、被測定試料中に含まれる、生体物質からなる被検出物質を検出するバイオセンシングに用いる検出液であって、

被検出物質の第 1 の部位と特異結合する生体物質を含む第 1 のプローブが第 1 の貴金属ナノ粒子の表面に固定されてなる第 1 のナノ粒子プローブと、

被検出物質の第 2 の部位と特異結合する生体物質を含む第 2 のプローブが第 2 の貴金属ナノ粒子の表面に固定されてなる第 2 のナノ粒子プローブとが緩衝性水溶液に分散されてなり、

被検出物質の第 1 の部位及び第 2 の部位の、これらの部位同士が近接する側の末端と、

第1のプローブ及び第2のプローブの基端とが特異結合するように、
第1のプローブと第2のプローブがそれぞれ、第1の貴金属ナノ粒子と第2の貴金属ナノ粒子に固定されてなることを特徴とするものである。

[0019] 本明細書において、緩衝性水溶液とは、一般に微生物の培養や化学物質、生体物質の保存、分離等に用いられる水溶液を意味し、外的要因（大気中の二酸化炭素など）あるいは内的要因（微生物自身の代謝産物など）によってほとんどpHが変動しない水溶液を意味する。

[0020] 第1のプローブ及び第2のプローブの基端とは、各プローブの貴金属ナノ粒子に結合している側の末端を意味するものとする。

[0021] 本発明の検出液の好ましい態様としては、第1のナノ粒子プローブ及び第2のナノ粒子プローブが、表面に、疎水性部と親水性部とを有する両親媒性の表面修飾が固定されてなり、この両親媒性の表面修飾の貴金属粒子に固定されている側が、疎水性部となっている態様が挙げられる。

[0022] かかる態様において、表面修飾の第1の貴金属ナノ粒子及び第2の貴金属ナノ粒子に固定されていない側の末端の官能基の帯電状態は、生体物質の帯電状態と同じであることが好ましい。

[0023] この、表面に、疎水性部と親水性部とを有する両親媒性の表面修飾が固定されてなる態様では、第1のプローブ及び第2のプローブが、第1の貴金属ナノ粒子と第2の貴金属ナノ粒子に、両親媒性の表面修飾により被検出物質との特異結合が阻害されることを抑止する緩衝部を介して固定されてなる態様がより好ましい。緩衝部は、少なくとも一部に親水性部を有していることが好ましい。

[0024] 表面修飾、及び、緩衝部における親水性部は、ポリエチレングリコール鎖又は糖鎖であることが好ましく、第1及び第2のプローブに対して相補鎖を生じさせない塩基配列を有することが好ましい。

[0025] また、両親媒性の表面修飾は、水溶性を有する自己組織化単分子膜であることが好ましい。

[0026] 本発明は、上記特異結合が、核酸のハイブリダイゼーションである場合に

好ましく適用することができる。

[0027] 本発明のバイオセンシング方法は、貴金属ナノ粒子を標識として、被測定試料中に含まれる、生体物質からなる被検出物質を検出するバイオセンシングにおいて、

上記本発明の検出液を調製する工程（A）と、

被検出物質と、第1のプロープ及び第2のプロープとが特異結合を形成する条件で、第1の部位と第2の部位を有する被検出物質を含む被測定試料と検出液とを混合する工程（B）と、

この混合により得られた溶液を用いて、貴金属ナノ粒子の標識を検出することにより被測定試料中の特異結合した被検出物質の有無を検出する工程（C）とを有するものである。

[0028] 工程（C）において、被検出物質の有無の検出は、ゲル電気泳動、散乱光の偏光異方指数により検出する方法、貴金属ナノ粒子の局在プラズモン共鳴波長シフトにより検出する方法、又は光散乱相関分光法により実施することが好ましい。

発明の効果

[0029] 本発明の検出液は、被検出物質の第1の部位と特異結合する生体物質を含む第1のプロープが第1の貴金属ナノ粒子の表面に固定されてなる第1のナノ粒子プロープと、被検出物質の第2の部位と特異結合する生体物質を含む第2のプロープが第2の貴金属ナノ粒子の表面に固定されてなる第2のナノ粒子プロープとが緩衝性水溶液に分散されてなり、
被検出物質の第1の部位及び第2の部位の、これらの部位同士が近接する側の末端と、第1のプロープ及び第2のプロープの基端とが特異結合するように、第1のプロープと第2のプロープがそれぞれ、第1の貴金属ナノ粒子と第2の貴金属ナノ粒子に固定されてなるものである。かかる検出液によれば、第1の貴金属ナノ粒子と第2の貴金属ナノ粒子とが近接するように第1のプロープと第2のプロープが被検出物質に特異結合するため、第1の貴金属ナノ粒子と第2の貴金属ナノ粒子が個々の粒子として検出されることを抑制し、ま

た、被検出物質の長さ（塩基数）によって生ずる、金ナノ粒子の間隔の違いを最小限にすることができる。従って、本発明によれば、貴金属ナノ粒子を標識として、被測定試料中に含まれる、生体物質からなる被検出物質を検出するバイオセンシングにおいて、検出感度及び精度の良好なバイオセンシングを実施することができる。

[0030] また、第1のナノ粒子プローブ及び第2のナノ粒子プローブが、表面に、疎水性部と親水性部とを有する両親媒性の表面修飾が表面に固定されてなり、この両親媒性の表面修飾の貴金属粒子に固定されている側が、疎水性部となっている態様では、貴金属ナノ粒子表面付近が疎水性であるため、プローブが貴金属ナノ粒子表面から離れて、貴金属ナノ粒子表面付近においてプローブが絡まることにより生じる非特異的な凝集を抑制することができる。従って、特異結合反応効率が高く、より検出精度の良好なバイオセンシングを実施することができる。

[0031] 更に、表面修飾の貴金属ナノ粒子に固定されていない側の末端の官能基（末端基）の帯電状態が、緩衝性水溶液中において、第1及び第2のプローブの帯電状態と同じである態様では、表面修飾の末端基と第1及び第2のプローブとが反発しあうことから、より効果的な、非特異的な凝集抑制効果及び特異結合の反応効率向上効果を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0032] [図1A]本発明の検出液の構成を示す概略断面模式図

[図1B]本発明の検出液に含まれるナノ粒子プローブの第1実施形態の構成を示す模式図

[図1C]本発明の検出液に含まれるナノ粒子プローブの第2実施形態の構成を示す模式図

[図2A]本発明の検出液に含まれる貴金属ナノ粒子の好適な態様を示す概略断面模式図。

[図2B]図2Aの貴金属ナノ粒子表面の一実施形態を示す拡大概略模式図

[図3A]本発明のバイオセンシング方法の工程（A）の好適な態様を示す概略

断面模式図

[図3B]本発明のバイオセンシング方法の工程（B）の好適な態様を示す概略

断面模式図

[図3C]本発明のバイオセンシング方法の工程（B）の別の好適な態様を示す

概略断面模式図

[図4A]工程（C）の検出をゲル電気泳動法により実施した場合の検出結果の

一例を示す模式図

[図4B]光偏光計測による検出に用いる装置の概略構成模式図

[図5]金ナノ粒子二量体による散乱光の偏光回転の説明図

[図6]図5の装置を用いて得られた計測結果の一例を示す図

[図7]異方指数を用いた検出例（粒子形状と異方指数A₁との相関）を示す図

[図8]光散乱相関分光法により得られた単量体及び二量体の自己相関関数

[図9]光散乱相関分光法による検出例（単体と二量体の減衰時間）

[図10]特許文献2の図40

発明を実施するための形態

[0033] 「検出液」

図面を参照して本発明にかかる一実施形態の検出液及びそれを用いたバイオセンシング方法について説明する。図1Aは本実施形態の検出液1の構成を示す概略断面模式図である。図2Aは、検出液1に含まれる第1及び第2の貴金属ナノ粒子プローブP1、P2の好適な態様を示す概略断面模式図、図2Bは、図2Aの貴金属ナノ粒子表面の拡大概略模式図である。本明細書の概略図及び模式図では、視認しやすくするため各部の縮尺は適宜変更して示してある。

[0034] 貴金属ナノ粒子を標識として用いたバイオセンシングでは、塩基数の比較的多いターゲット遺伝子の検出に好適である、複数のプローブのハイブリダイゼーションによる検出方法においても、従来、貴金属ナノ粒子側に結合されているプローブ末端（基端）が、被検出物質の両端に特異結合される構成としている。

[0035] 「背景技術」の項においても述べたように、本発明者は、従来の貴金属ナノ粒子プローブの構成では、ターゲット遺伝子の塩基数（長さ）によって、金ナノ粒子の間隔にばらつきを生じること、また、塩基数の多いターゲット遺伝子の検出では、第1の貴金属ナノ粒子と第2の貴金属ナノ粒子が個々の粒子として検出されやすいことが、測定精度や検出感度の低下の要因であることを見出し、本発明を完成させた。

[0036] 生体物質の特異結合には、抗原－抗体結合、DNAやRNA、PNA（Peptide Nucleic Acid、ペプチド核酸）等の核酸の相補的結合（ハイブリダイゼーション）、ビオチン－アビジン結合、抗原－アプタマー結合、糖鎖－レクチン結合等があり、本発明はいずれの特異結合にも適用可能である。

[0037] また、本発明において、貴金属ナノ粒子は特に制限されず、使用する光の波長において呈色特性の良好な貴金属を選択することが好ましい。中でも金は、自然光において視認しやすい赤色の呈色を示すことから好ましく利用することができる。

[0038] 以下、貴金属ナノ粒子が金ナノ粒子であり、親水性の生体物質（プローブ）が核酸断片であり、特異結合が核酸の相補的結合H（ハイブリダイゼーション）である場合を例に説明する。

[0039] 図1Aに示されるように、検出液1は、貴金属ナノ粒子を標識として、被測定試料中に含まれる、生体物質からなる被検出物質を検出するバイオセンシングに用いる検出液であって、図1Bに示される被検出物質50の第1の部位50Aと特異結合する生体物質を含む第1のプローブ20Aが第1の貴金属ナノ粒子10Aの表面に固定されてなる第1のナノ粒子プローブP1と、
被検出物質50の第2の部位50Bと特異結合する生体物質を含む第2のプローブ20Bが第2の貴金属ナノ粒子10Bの表面に固定されてなる第2のナノ粒子プローブP2とが緩衝性水溶液40に分散されてなるものである。

[0040] 第1及び第2のナノ粒子プローブP1、P2は、図1B又は図1Cに示されるように、被検出物質50の第1の部位50A及び第2の部位50Bの、

これらの部位同士が近接する側の末端 50A t, 50B t と、
第1のプロープ20A及び第2のプロープ20Bの基端20A b, 20B b
とが特異結合するように、
第1のプロープ20Aと第2のプロープ20Bがそれぞれ、第1の貴金属ナノ粒子10Aと第2の貴金属ナノ粒子10Bに固定されてなる。

[0041] また、本実施形態では、第1のナノ粒子プロープP1及び第2のナノ粒子プロープP2において、貴金属ナノ粒子10A, 10B表面に、疎水性部と親水性部とを有する両親媒性の表面修飾30が表面に固定されてなる。

[0042] 図1Bに示されるナノ粒子プロープP1及びP2の第1実施形態は、被検出物質50のナノ粒子プロープP1と第2のナノ粒子プロープP2が特異結合する第1の部位50Aと第2の部位50Bとが隣接している態様である。ナノ粒子プロープP1及びP2は、かかる態様に限定されるものではなく、図1Cに示されるように、第1の部位50Aと第2の部位50Bとは隣接しておらず、間にいくつかの塩基配列を備えてなる態様であってもよい（第2実施形態）。

[0043] 更に、図1B, 図1Cでは、被検出物質50の両末端に特異結合する第1のナノ粒子プロープP1と第2のナノ粒子プロープP2が特異結合する態様について示してあるが、被検出物質50における特異結合部位については特に制限されない。

[0044] また、図2Aに示されるように、本実施形態では、緩衝性水溶液40中において、第1及び第2のナノ粒子プロープP1及びP2は、両親媒性の表面修飾30の貴金属ナノ粒子10A, 10Bに固定されていない側の末端が負の電荷を有し、第1及び第2のプロープ20A, 20Bも負の電荷を有している。

[0045] 両親媒性の表面修飾30は、図2Bに示されるように、金ナノ粒子10A, 10Bに固定されている疎水性部31と親水性部32とを有している。図2Bでは、基端30aの官能基がチオール基であるアルキル基（炭素数11）からなる疎水性部31と、末端基30eがカルボキシル基であるポリエチ

レングリコール（炭素数6）からなる親水性部32とがエステル結合してなる表面修飾30を例に図示してある。なお、図2Bでは、カルボキシル基として示してあるが、緩衝性水溶液中では COO^- として存在する。

[0046] また、図2Bにおいては、第1のプロープ20A及び第2のプロープ20Bが、第1の金ナノ粒子10Aと第2の金ナノ粒子10Bに、両親媒性の表面修飾30により被検出物質50との特異結合が阻害されることを抑止する緩衝部21を介して固定されてなり、金ナノ粒子10A（10B）に固定された表面修飾30の基端30a及び緩衝部21の基端21aの双方がチオール基である態様において、既に金と結合された状態を示してある。緩衝部21と結合しているそれぞれプロープの基端20Ab（20Bb）が、被検出物質50の第1の部位50A及び第2の部位50Bの、これらの部位同士が近接する側の末端50At、50Btと特異結合する。

[0047] 金ナノ粒子10の大きさは、光の照射により局在プラズモンを誘起可能な大きさであれば特に制限されず、個々の粒径は光の波長の半分以下であることが好ましく、10nm以上100nm以下であることがより好ましい。さらに光学的検出を行う場合、粒子径は、30nm以上であることが好ましい。

[0048] 検出液1中の金ナノ粒子10の濃度は、感度の良い検出が可能であれば特に制限されないが、検出したい非検出物質の濃度（定量領域）に応じて、適宜、 0.1 pmol/l 以上 10000 pmol/l 以下の範囲に調整することが好ましい。

[0049] 図2Bでは、第1及び第2のプロープ20A（20B）の基端20Ab（20Bb）側に緩衝部21を備え、緩衝部21にチオール基を備えて金ナノ粒子10に固定された態様について図示してあるが、金ナノ粒子10と結合する側の官能基は、金ナノ粒子10の金属と結合可能な官能基であれば特に制限されず、チオール基以外では、ジスルフィド基、メルカプト基等が挙げられる。これらの官能基の固定方法としては、特に制限されず既存の技術を利用することができる。

[0050] 本発明者は、金ナノ粒子10の粒径によっては立体障害により、近接させた状態で相補的結合H（ハイブリダイゼーション）を生じさせる際、金ナノ粒子10に固定された側のプローブの基端（20Ab、20Bb）の10～20塩基程度がハイブリダイゼーションに寄与できず、これが、被検出物質50とのハイブリダイゼーション効率の低下、および検出限界の悪化を招くことがあることを見出した。

[0051] 立体障害を少なくするためには、粒径は小さい方が好ましいが、光の波長以下の粒径の金ナノ粒子の散乱光量、即ち光学的検出における信号光量は、レイリー散乱の法則により、粒子径の6乗に比例して急激に小さくなるため、粒径が小さすぎると信号光がノイズに埋もれてしまい、光学的な検出感度が大幅に悪化する（非特許文献3を参照）。従って、光学的検出を行う場合、金ナノ粒子10（10A、10B）の個々の粒径は、30nm以上であることが好ましい。

[0052] 一方、金ナノ粒子10の粒径が十分な光学信号量を得られる粒径（例えば、 $\phi \geq 30\text{nm}$ ）である場合、立体障害が問題になるだけでなく、プローブ20に対して粒子の表面積が大きくなるため金ナノ粒子10の表面にプローブ20が吸着しやすく、反応効率が大幅に低下するとともに、複数のプローブ同士が絡み合うことによる非特異反応により検出感度が悪化してしまう問題を生じる。

[0053] 本発明者らは、本実施形態に示すように、金ナノ粒子10の表面に両親媒性の表面修飾30を備えることにより、プローブ20を表面に吸着させずにブラシ状に起立させ、更にプローブ20を、緩衝部21を介して金ナノ粒子10の表面に固定することにより、両親媒性の表面修飾30により被検出物質50との特異結合が阻害されることを抑止して、非特異反応及び立体障害による検出感度及び反応効率の悪化を抑制することに成功した。

[0054] 緩衝部21は、被検出物質50と相補的なプローブ部分を表面修飾（30）の外側の金ナノ粒子の立体障害を受けにくい場所に配置し、被検出物質50との特異結合が阻害されることを抑止することを可能にするものであるの

で、表面修飾30の金ナノ粒子10に接する疎水性部31に埋もれないように、少なくとも一部に親水性部を有することが好ましい。

[0055] かかる親水性部としては、緩衝部21は、少なくとも一部に親水性部を有することが好ましい。親水性部としては、緩衝性水溶液中への分散性（水溶性）を良好にしうるものであれば特に制限されないが、ポリエチレングリコール（PEG）鎖、糖鎖、親水性ポリエステル、プローブに対して相補鎖を生じさせない塩基配列（例えば、T；チミンの繰返し・羅列）等が挙げられる。

[0056] また、緩衝部21の長さは、表面修飾30の厚みよりも長いことが好ましく、緩衝部21と結合する第1及び第2のプローブ20（A，B）の基端20A b（20B b）が、表面修飾30内に埋もれない長さであることがより好ましい。緩衝部21は、金ナノ粒子10A（10B）の粒径およびプローブ長を考慮し、適宜材料設計することが好ましい。

[0057] 検出液1において、表面修飾30は、第1及び第2のプローブ20A（20B）が、金ナノ粒子10の表面10s付近で絡まり合うことにより生じる非特異結合の検出を抑制するためのものであるので、第1及び第2のプローブ20A（20B）の長さよりも1分子の長さが短いものであることが好ましい。

[0058] 第1及び第2のプローブ20A（20B）が20塩基のオリゴDNAである場合は、その鎖長は7nm前後である。これに対して良好な効果が得られる表面修飾30の厚み（表面10sから末端までの距離）は、3.0nm程度が好ましい。

[0059] 表面修飾30において、疎水性部31は、基端30aが金ナノ粒子10と結合可能な官能基であるアルキル基であることが好ましい。基端30aの官能基としては、緩衝部21と同様、チオール類やジスルフィド類等の硫黄化合物が挙げられる。

[0060] 疎水性部31の金ナノ粒子10の固定側と反対側の末端には、親水性部32が備えられている。親水性部32は、疎水性部31で覆われることにより

緩衝性水溶液 40 における分散性の低下を改善するものである。

[0061] 疎水性の大きい表面修飾 30 および疎水性部 31 にて覆われた金ナノ粒子は、水溶性が低くなっているため、緩衝性水溶液中に良好に分散させるためには、アルコール等の相溶性の高い溶媒を一旦介して分散させる必要があるが、これにより、核酸等の生体物質を損傷して変性し、非特異の凝集が増えて良好なセンシングを行うことが難しくなる可能性が高い。非特異的な凝集の増加は特異結合反応の失活をも引き起こし、該反応の反応効率を低下させる。特に、疎水性部のアルキル鎖の炭素数が 7 以上である場合には疎水性が高いため水溶性（分散性）が非常に低くなる。

[0062] 本発明者は、疎水性部 31 の金ナノ粒子 10 の固定側（基端）と反対側の末端に、親水性部 32 を備えた表面修飾 30 とすることにより、上記第 1 及び第 2 のプローブ 20A（20B）同士の絡まりの抑制効果を維持しつつ、緩衝性水溶液中への分散性が良く生体物質へのダメージが殆どない検出液となることを見出している。

[0063] 本実施形態によれば、金ナノ粒子表面 10s 付近に絡み合っている生体物質を該表面から剥がし、特異反応効率を高め、非特異結合による凝集を抑制することができる。

[0064] 親水性部 32 としては、緩衝性水溶液中への分散性（水溶性）を良好にするものであれば特に制限されないが、ポリエチレングリコール（PEG）鎖、糖鎖、親水性ポリエステル、プローブに対して相補鎖を生じさせない塩基配列（例えば、T；チミンの繰返し・羅列）等が挙げられ、水溶性を付与し、且つ、表面修飾 30 が自己組織化単分子膜となり得るものが好ましい。

[0065] 親水性部 32 の末端基 30e は特に制限されず、ヒドロキシル基、カルボシキル基、リン酸基、スルホン酸基等が挙げられる。末端基 30e がヒドロキシル基等の酸性官能基ではない官能基であっても、金ナノ粒子表面 10s 付近に絡み合っている生体物質を剥がすことはできるが、第 1 及び第 2 のプローブ 20A（20B）を該表面から立ち上がった状態でブラシ状に固定するには至らない。

- [0066] 図2A, Bに示されるように、親水性部32の末端基30eが、核酸断片20の緩衝性水溶液中での帯電状態と同じである場合、表面修飾30の表面(30e)と核酸断片20とが反発しあい、核酸断片20がより金ナノ粒子表面10sから遠ざかるべく立ち上がるため、ブラシ状に固定される。その結果、同一配列のみの非特異凝集をより効果的に抑制することができる。
- [0067] 第1及び第2のプローブ20A(20B)の緩衝性水溶液中での帯電状態は負であることから、末端基30eは緩衝性水溶液中において負イオンになるイオン化傾向が高い官能基、すなわち、酸性官能基であることが好ましい。PEGの場合はヒドロキシル基であり、酸性官能基ではないことから、図示されるカルボキシル基、やスルホン酸基等に置換して用いることが好ましい。これらの官能基の固定方法としては、特に制限されず既存の技術を利用することができる。
- [0068] 表面修飾30は、上記のように、金ナノ粒子10へ固定する側の末端にチオール類やジスルフィド類等の硫黄化合物の官能基を備えている。これらの硫黄化合物の官能基は、金等の貴金属表面上に自発的に吸着し、アルカンチオール類やアルカンジスルフィド類は、単分子サイズの超薄膜(単分子膜)を与える。また、その集合体は粒子の結晶状態や吸着分子の分子構造に依存した配列を示すことから自己組織化単分子膜と呼ばれており、貴金属表面への固定が容易であり好ましい。
- [0069] 好適な表面修飾30としては、20-(11-メルカプトウンデカンイルオキシ)-3,6,9,12,15,18-ヘキサオキサエイコサン酸(英語名: 20-(11-Mercaptoundecanyloxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosanoic acid)の自己組織化単分子膜が挙げられる。この単分子の長さは2.5nm~3.0nm程度であり、そのうち疎水性部31長が約1.2nmである。
- [0070] 表面修飾30の検出液1中の濃度(単分子の濃度)は、感度の良い検出が可能であれば特に制限されないが、10nmol/l以上1000nmol/l以下の範囲が好ましく、貴金属ナノ粒子の材質や粒子径、および生体物質の種類によって最適化することが好ましい。

[0071] 以上述べたように、検出液 1 は、被検出物質 50 の第 1 の部位 50 A と特異結合する生体物質を含む第 1 のプローブ 20 A が第 1 の貴金属ナノ粒子 10 A の表面に固定されてなる第 1 のナノ粒子プローブ P 1 と、被検出物質の第 2 の部位 50 B と特異結合する生体物質を含む第 2 のプローブ 20 B が第 2 の貴金属ナノ粒子 10 B の表面に固定されてなる第 2 のナノ粒子プローブ P 2 とが緩衝性水溶液 40 に分散されてなり、
被検出物質の第 1 の部位 50 A 及び第 2 の部位 50 B の、これらの部位同士が近接する側の末端 50 A t, 50 B t と、第 1 のプローブ及び第 2 のプローブの基端 20 A b, 20 B b とが特異結合するように、第 1 のプローブ 20 A と第 2 のプローブ 20 B がそれぞれ、第 1 の貴金属ナノ粒子 10 A と第 2 の貴金属ナノ粒子 10 B に固定されてなるものである。かかる構成によれば、第 1 の貴金属ナノ粒子 10 A と第 2 の貴金属ナノ粒子 10 B とが近接するように第 1 のプローブ 20 A と第 2 のプローブ 20 B が被検出物質に特異結合するため、第 1 の貴金属ナノ粒子 10 A と第 2 の貴金属ナノ粒子 10 B が個々の粒子として検出されることを抑制し、また、被検出物質の長さ（塩基数）によって生ずる、金ナノ粒子の間隔の違いを最小限にすることができる。

[0072] 従って、検出液 1 を用いることにより、貴金属ナノ粒子を標識として、被測定試料中に含まれる、生体物質からなるターゲット遺伝子を検出するバイオセンシングにおいて、検出感度及び精度の良好なバイオセンシングを実施することができる。

[0073] 「バイオセンシング方法」

図面を参照して、本発明にかかる一実施形態のバイオセンシング方法について説明する。図 3 A、図 3 B、図 3 C は本発明のバイオセンシング方法の工程（A）～工程（C）の好適な態様を示す概略模式図である。

[0074] 本発明のバイオセンシング方法は、貴金属ナノ粒子を標識として、被測定試料中に含まれる、生体物質からなる被検出物質を検出するバイオセンシングにおいて、

上記本発明の検出液を調製する工程（A）と、

被検出物質と、第1のプロープ及び第2のプロープとが特異結合を形成する条件で、第1の部位と第2の部位を有する被検出物質を含む被測定試料と検出液とを混合する工程（B）と、

この混合により得られた溶液を用いて、貴金属ナノ粒子の標識を検出することにより被測定試料中の特異結合した被検出物質の有無を検出する工程（C）とを有するものである。

[0075] ここでも、被検出物質が核酸断片と相補的に結合する核酸断片50であり、貴金属ナノ粒子10が金ナノ粒子である場合を例に説明する。

[0076] <工程（A）>

図3Aに示されるように、工程（A）では上記本発明の検出液1を調製する。検出液1には、第1のナノ粒子プロープP1と第2のナノ粒子プロープP2とが含まれている。従って、まず、それぞれのナノ粒子プロープを調製し、それらを混合することにより検出液1を得る。

[0077] まず、ビーカー等の容器に緩衝性水溶液40を所定量注入し、その中に、複数の貴金属ナノ粒子10Aを添加する（A-1）。この工程は、非加熱にて実施してよい。

[0078] 次に、第1のプロープ20Aを金ナノ粒子10Aの表面に固定する（A-2）。このとき、被検出物質50の第1の部位50Aの、第2の部位50Bと近接する側の末端50Atと、第1のプロープの金ナノ粒子10Aに結合される側の基端20Abとが特異結合するようにするために、第1のプロープの基端20Abを官能化しておく。基端20Abの官能基については既に述べたとおりであり、第1のプロープ20Aを、緩衝部21を介して金ナノ粒子10Aに固定する場合は、緩衝部21の金ナノ粒子10Aに固定される側を官能化しておく。官能化の方法は公知の方法を用いてよい。

[0079] 次に、第1のプロープ20Aが固定された金ナノ粒子10Aの表面に、疎水性部31と親水性部32とを有する両親媒性の表面修飾30を、疎水性部31側の基端30aが金ナノ粒子10の表面10sに固定されるように固定して、第1のナノ粒子プロープP1を得る（A-3）。

[0080] 金ナノ粒子10への表面修飾30の固定温度及びその固定に要する反応時間は、単分子膜の材料に応じて適宜設定すればよく、20-(11-メルカプトウンデカンイルオキシ)-3,6,9,12,15,18-ヘキサオキサエイコサン酸の場合は、50℃前後の温度にて3時間程反応させることにより形成することができる。

[0081] 次に、被検出物質50の第2の部位50Bと特異結合するようにする以外は第1のナノ粒子プローブP1と同様にして第2のナノ粒子プローブP2を調製する。

[0082] 最後に、第1のナノ粒子プローブP1と第2のナノ粒子プローブP2とを混合して、緩衝性水溶液40中に第1のナノ粒子プローブP1と第2のナノ粒子プローブP2が分散されてなる検出液1を得る(A-4)。

[0083] <工程(B)>

工程(B)は、検出液1中に被測定試料を混合して、被測定試料中の被検出物質50と、検出液1中の第1及び第2のプローブ20A, 20Bとの相補的結合Hの形成(特異結合)反応を実施する工程である。

[0084] 核酸同士の相補鎖の形成(ハイブリダイゼーション)は、核酸断片(一本鎖)が一本鎖として存在できる温度(融解温度)よりも若干低い温度条件で形成されることが知られている。工程(B)において、特異結合反応(ハイブリダイゼーション)の条件は、相補鎖の形成へ悪影響を及ぼす核酸断片の損傷及び、各核酸断片の金ナノ粒子への固定態様の悪化がない範囲で適宜設定することができる。

[0085] 図3B, 図3Cには、検出液1中に被検出物質50を含む被測定資料を混合した際の、検出系の一例を示してある。図3Bは、図1Bに示される第1実施形態のナノ粒子プローブP1及びP2を用いた場合の検出系であり、被検出物質50のナノ粒子プローブP1と第2のナノ粒子プローブP2が特異結合する第1の部位50Aと第2の部位50Bとが隣接している。図3Cは、図1Cに示される第2実施形態のナノ粒子プローブP1, P2を用いた場合の検出系であり、第1の部位50Aと第2の部位50Bとは隣接しておらず、間にいくつかの塩基配列を備えてなる態様である。

- [0086] 図3B、図3Cに示されるように、本発明の検出液1によれば、被検出物質の第1の部位50A及び第2の部位50Bの、これらの部位同士が近接する側の末端50At、50Btと、第1のプロープ及び第2のプロープの基端20Ab、20Bbとが特異結合するため、第1の金ナノ粒子10Aと第2の金ナノ粒子10Bとが最も近接する形で相補鎖が形成される。
- [0087] 従って、相補鎖の形成により最も2量体に近い形で2つの金ナノ粒子が存在させることが可能となり、後工程(C)において良好な検出感度及び検出精度にて、相補鎖の形成を検出することができる。
- [0088] 図3Bに示される系では、後工程(C)において、相補鎖の形成時には2量体として略同じ大きさの粒子として検出することが可能となり、また図3Cに示される系においても、最も2量体に近い形での検出を可能にする。従来の検出液では、塩基数の長い場合に、相補鎖の形成後の第1の金ナノ粒子10Aと第2の金ナノ粒子10Bとの距離が大きすぎて検出感度及び検出精度が大きく低下したが、本発明によれば、第1の金ナノ粒子10Aと第2の金ナノ粒子10Bが個々の粒子として検出されることを抑制し、その低下を最小限にすることができる。
- [0089] また、上記検出液1としては、第1のナノ粒子プロープP1及び第2のナノ粒子プロープP2が、表面に、疎水性部31と親水性部32とを有する両親媒性の表面修飾30が表面に固定されてなり、この両親媒性の表面修飾30の貴金属ナノ粒子10A、10Bに固定されている側が、疎水性部31となっている態様について説明した。かかる態様においては、貴金属ナノ粒子表面付近が疎水性であるため、プロープが貴金属ナノ粒子表面から離れて、貴金属ナノ粒子表面付近においてプロープが絡まることにより生じる非特異的な凝集を抑制することができる。従って、特異結合反応効率が高く、より検出精度の良好なバイオセンシングを実施することができる。
- [0090] 更に、上記では、表面修飾30の貴金属ナノ粒子に固定されていない側の末端30eの官能基の帯電状態が、緩衝性水溶液40中において、第1及び第2のプロープ20A、20Bの末端の帯電状態と同じである態様とした。

かかる態様では、表面修飾30の末端基30eと第1及び第2のプローブ20A、20Bとが反発しあうことから、より効果的な、非特異的な凝集抑制効果及び特異結合の反応効率向上効果を得ることができる。

[0091] <工程(C)>

工程(C)は、工程(B)において混合された混合溶液を用いて、金ナノ粒子標識を検出することにより相補鎖の形成(特異結合)Hを検出し、被測定試料中の被検出物質50の有無を検出する工程である。

[0092] 工程(C)における検出方法は特に制限されず、ゲル電気泳動、散乱光の偏光異方指数により検出する方法、貴金属ナノ粒子の局在プラズモン共鳴波長シフトにより検出する方法、又は光散乱相関分光法により実施することが好ましい。

[0093] 図4Aは、被検出物質50の有無の検出を、ゲル電気泳動により実施する態様について、ゲル電気泳動装置100の概略構成と、バンドDの検出例を示す上面模式図を示したものである。

[0094] ゲル電気泳動装置100は、容器内にゲルマトリックス102が設置されてなり、検出する試料を分注するウェル101と電圧印加手段とを備えている。

[0095] 本実施形態では、工程(B)にて調製した混合溶液をウェル101に分注し、ウェル101側がマイナスとなるように電圧を印加して電気泳動を実施する。電圧印加の際の方向は被検出物質の帯電状態によって決定する。

[0096] 電気泳動では、ゲルマトリックス中を核酸断片又は核酸相補鎖が移動する際、その分子量によって移動度が変化するため、重いもの、すなわち相補鎖を形成しているものほど移動量が少なく手前側(ウェル側)となり、一本鎖はより遠くまで移動するため、一定時間電圧を印加した後に金ナノ粒子10にプラズモンを誘起可能な波長の光を含む光を照射することにより、赤色に呈色したバンドDとなって特異結合(ハイブリダイゼーション)の有無、すなわち、被検出物質の有無を検出することができる。

[0097] バンドDにおける各バンドの同定は、バンドを切り出してTEM観察する

ことにより実施することができる。より移動度の大きかった最下流のバンドでは相補鎖が形成されていない1個の金ナノ粒子10が観察され、上流側に行くにつれ、金ナノ粒子10が2個、3個結合された、すなわち相補鎖の形成が確認される。

[0098] ゲル電気泳動による検出は、比較的高濃度の検体が必要となるため、微量な検体の検出には、より高感度な検出方法により検出する必要がある。本発明者らは、図4Bに概略構成が示される光学異方性検出装置200を用い、略等方性の貴金属ナノ粒子がハイブリダイズされて二量体となることにより出現する異方性を検出することによってハイブリダイゼーションの有無を検出する方法により、高感度な検出が可能となることを見出した。

[0099] 光学異方性検出装置200は、試料（混合溶液）を設置する透明の試料台210と、レーザ230と、ビームスプリッター221と対物レンズ222とからなる照射受光光学系220と、 $\lambda/2$ 板240と、P偏光とS偏光に分離する偏光ビームスプリッタ250と、各偏光をそれぞれ検出するフォトダイオード261、262と、検出信号を表示するオシロスコープ270とから構成されている。

[0100] 光学異方性検出装置200による検出原理を、図5を参照して説明する。図5に示されるように、検体の含まれる試料内に直線偏光E0が入射されると、等方性の粒子に照射された直線偏光E0により生じる散乱光は直線偏光E0と略同様の偏光面を有している。一方、異方性を有する（ $P_{long} \neq P_{short}$ ）二量体等の多量体に照射された直線偏光E0により生じる散乱光は、長軸（ P_{long} 方向）方向と短軸方向（ P_{short} 方向）とで誘起される双極子モーメントが異なることに起因して偏光回転を生じる。この現象を利用し、偏光面の回転の有無を検出することにより、ハイブリダイゼーションの有無を検出することができる。

[0101] 具体的には、倒立顕微鏡（例えば、N i k o n社製）等を用いて図4Bに示される検出装置を構成して測定を行う。まず、半導体レーザ230を対物レンズ222にて試料台210上の試料S内に集光して微小スポットを形成

し、微小スポットをブラウン運動により回転しながら単量体や二量体粒子が通過することにより生じる散乱光を対物レンズ 222 にて集光し、集光された光を偏光ビームスプリッタ 250 で直交する偏光成分に分離する。分離された散乱光をそれぞれフォトダイオード 261, 262 にて受光してオシロスコープ 270 にその強度の時間トレースを表示させ、それを下記式 (1) で表される偏光異方指数 A_I の時間トレースと照合することにより、試料内の貴金属ナノ粒子の光学異方性を定量化してハイブリダイゼーションの有無を検出する。

[0102] 微小スポットを通過する際、単量体や二量体の粒子は十分な回数回転するので、光の偏光方向に対してあらゆる配置をとることができる。従って、偏光異方指数 A_I の最大値に着目し、該 A_I 値を与える時間における各偏光強度及びその位相のずれから、二量体の有無、すなわちハイブリダイゼーションを検出する。

[0103] 図 6 に、二量体の存在している場合の上記方法による検出結果の一例を示す。図 6 上図は、オシロスコープにて検出された各偏光強度の時間トレース、下図は A_I 値の時間変化を示しており、両図の時間軸は一致している。

[0104] 図 6 下図において、 A_I の最大値を破線で囲んである。そのピークの時間における上図のスペクトルでは、 x 方向の強度 I_x が凸部、 I_y が凹部となっている (x 方向の偏向強度が大きいと y 方向の偏向強度が小さくなっている) ことが示されている。これは、二量体が存在していると、その回転により偏光方向も追隨して回転することから、位相が逆転することによるものである。

$$A_I = (I_x - I_y) / (I_x + I_y) \quad \dots \quad (1)$$

(I_x は x 方向の散乱光強度, I_y は x 方向に直交する散乱光強度, x 方向は入射光の偏光方向である)

[0105] 実際の単量体と二量体に上記方法による各偏光強度の測定を実施し、偏光異方指数 A_I を計算した結果を図 7 に示す。

[0106] 図 7 に示されるように、異方指数 $A_I = 1.3$ を境に、単量体と二量体と

を明確に区別することができる。

[0107] 微量な検体の検出は、上記の方法以外に、蛍光相関分光法における蛍光の代わりに、貴金属ナノ粒子のプラズモン共鳴による強い散乱光を用いた光散乱相関分光法により、貴金属ナノ粒子の試料液中での回転運動の時定数から検出することも可能である。

[0108] 光散乱相関分光法により得られた単量体及び二量体の自己相関関数を図8（左側は単量体（単体）、右側は二量体）に示す。二量体の回転拡散速度は単量体の約4倍程度であることが理論的に予測されており、図8に示される自己相関関数の減衰時間の差はその差を反映したものと考えられる。

[0109] 実際の単量体と二量体に光散乱相関分光法による各偏光強度の測定を実施した結果を図9に示す。図9に示されるように、異方指数を用いた方法に比して単量体と二量体との境界は不明確ではあるが、単量体と二量体とを区別することができる。

[0110] 更に、検出液1及び本発明のバイオセンシング方法は、工程（C）において、被検出物質50の有無を、貴金属ナノ粒子の局在プラズモン共鳴波長シフトにより検出する態様にも好適である。

[0111] 本発明のバイオセンシング方法は、上記本発明の検出液を用いてセンシングを行うものであるので、本発明の検出液と同様の効果を奏する。

[0112] （設計変更）

上記実施形態では、より検出感度及び検出精度が良好となる態様である、第1のナノ粒子プローブ及び第2のナノ粒子プローブが、表面に、疎水性部と親水性部とを有する両親媒性の表面修飾が表面に固定されてなる態様について説明したが、かかる表面修飾を備えていない態様であっても、被検出物質の長さ（塩基数）によって、金ナノ粒子の間隔の違いを最小限にすることができ、検出感度及び精度の良好なバイオセンシングを実施することができる。

[0113] 更に、上記実施形態では、緩衝部を備えた構成について説明したが、緩衝部を備えていない態様であっても、被検出物質の長さ（塩基数）によって、

金ナノ粒子の間隔の違いを最小限にすることができ、検出感度及び精度の良好なバイオセンシングを実施することができる。

[0114] また、上記実施形態では、被検出物質が核酸断片であり、特異結合が核酸のハイブリダイゼーションである場合を例に説明したが、本発明はその構成に限定されるものではなく、既に述べたような、抗原抗体結合、アビジン-ビオチン結合等、様々な特異結合の有無のセンシングに適用することができる。

[0115] 被検出物質の末端基が酸性である場合について説明したが、塩基性である場合は、表面修飾30の末端基30eとしては、例えば、アミノ基、第4級アンモニウム基、イミダゾール基、グアニジウム基等が挙げられる。

請求の範囲

- [請求項1] 貴金属ナノ粒子を標識として、被測定試料中に含まれる、生体物質からなる被検出物質を検出するバイオセンシングに用いる検出液であって、
- 前記被検出物質の第1の部位と特異結合する生体物質を含む第1のプローブが第1の前記貴金属ナノ粒子の表面に固定されてなる第1のナノ粒子プローブと、
- 前記被検出物質の第2の部位と特異結合する生体物質を含む第2のプローブが第2の前記貴金属ナノ粒子の表面に固定されてなる第2のナノ粒子プローブとが緩衝性水溶液に分散されてなり、
- 前記第1の部位及び前記第2の部位の、該部位同士が近接する側の末端と、
- 前記第1のプローブ及び前記第2のプローブの基端とが特異結合するように、
- 前記第1のプローブと前記第2のプローブがそれぞれ、前記第1の貴金属ナノ粒子と第2の貴金属ナノ粒子に固定されてなる検出液。
- [請求項2] 前記第1のナノ粒子プローブ及び前記第2のナノ粒子プローブは、前記表面に、疎水性部と親水性部とを有する両親媒性の表面修飾が固定されてなり、前記両親媒性の表面修飾の前記粒子に固定されている側が、前記疎水性部である請求項1記載の検出液。
- [請求項3] 前記表面修飾の前記第1の貴金属ナノ粒子及び前記第2の貴金属ナノ粒子に固定されていない側の末端の官能基の帯電状態が、前記生体物質の帯電状態と同じである請求項2記載の検出液。
- [請求項4] 前記第1のプローブ及び前記第2のプローブは、前記第1の貴金属ナノ粒子と第2の貴金属ナノ粒子に、前記表面修飾により前記特異結合が阻害されることを抑止する緩衝部を介して固定されてなることを特徴とする請求項1～3いずれか1項記載の検出液。
- [請求項5] 前記親水性部がポリエチレングリコール鎖であることを特徴とする請

求項 2 ～ 4 いずれか 1 項記載の検出液。

[請求項6] 前記親水性部が糖鎖であることを特徴とする請求項 2 ～ 4 いずれか 1 項記載の検出液。

[請求項7] 前記親水性部が前記第 1 及び第 2 のプローブに対して相補鎖を生じさせない塩基配列であることを特徴とする請求項 2 ～ 4 いずれか 1 項記載の検出液。

[請求項8] 前記両親媒性の表面修飾が、水溶性を有する自己組織化単分子膜であることを特徴とする請求項 2 ～ 7 いずれか 1 項記載の検出液。

[請求項9] 前記緩衝部が、親水性部を有することを特徴とする請求項 4 ～ 8 いずれか 1 項記載の検出液。

[請求項10] 前記緩衝部の前記親水性部がポリエチレングリコール鎖であることを特徴とする請求項 9 に記載の検出液。

[請求項11] 前記緩衝部の前記親水性部が糖鎖であることを特徴とする請求項 9 に記載の検出液。

[請求項12] 前記緩衝部の前記親水性部が前記第 1 及び第 2 のプローブに対して相補鎖を生じさせない塩基配列であることを特徴とする請求項 9 に記載の検出液。

[請求項13] 前記特異結合が核酸のハイブリダイゼーションであることを特徴とする請求項 1 ～ 12 いずれか 1 項記載の検出液。

[請求項14] 貴金属ナノ粒子を標識として、被測定試料中に含まれる、生体物質からなる被検出物質を検出するバイオセンシングにおいて、

前記請求項 1 ～ 13 いずれか 1 項記載の検出液を調製する工程（A）と、

前記被検出物質と、前記第 1 のプローブ及び前記第 2 のプローブとが前記特異結合を形成しうる条件で、前記第 1 の部位と前記第 2 の部位を有する前記被検出物質を含む被測定試料と前記検出液とを混合する工程（B）と、

該混合により得られた溶液を用いて、前記標識を検出することによ

り前記被測定試料中の前記特異結合した前記被検出物質の有無を検出する工程（C）とを有することを特徴とするバイオセンシング方法。

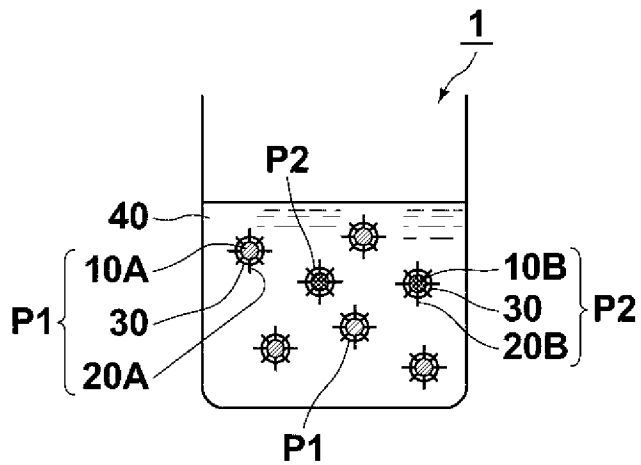
[請求項15] 前記工程（C）において、前記被検出物質の有無の検出を、ゲル電気泳動により実施することを特徴とする請求項14に記載のバイオセンシング方法。

[請求項16] 前記工程（C）において、前記被検出物質の有無を、散乱光の偏光異方指数により検出することを特徴とする請求項14に記載のバイオセンシング方法。

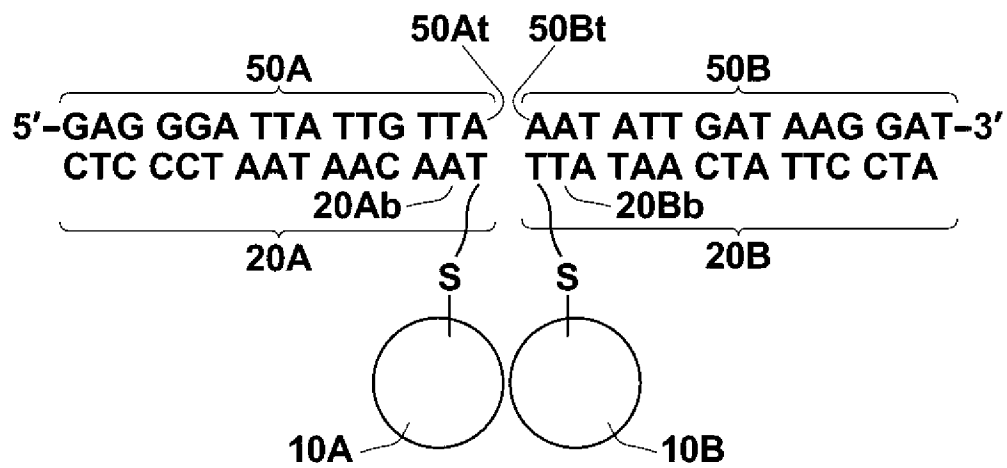
[請求項17] 前記工程（C）において、前記被検出物質の有無を、光散乱相関分光法により検出することを特徴とする請求項14に記載のバイオセンシング方法。

[請求項18] 前記工程（C）において、前記被検出物質の有無を、貴金属ナノ粒子の局在プラズモン共鳴波長シフトにより検出することを特徴とする請求項14に記載のバイオセンシング方法。

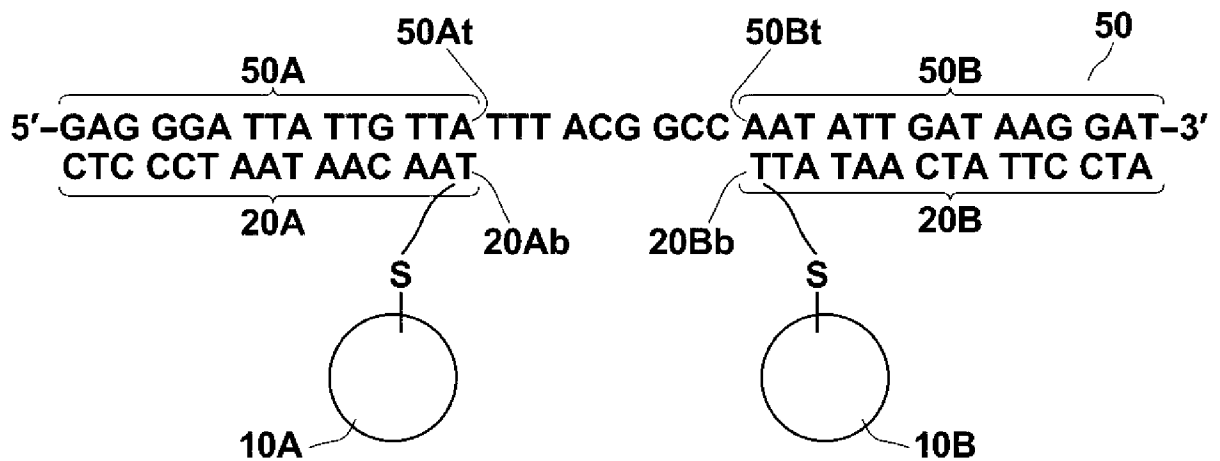
[図1A]



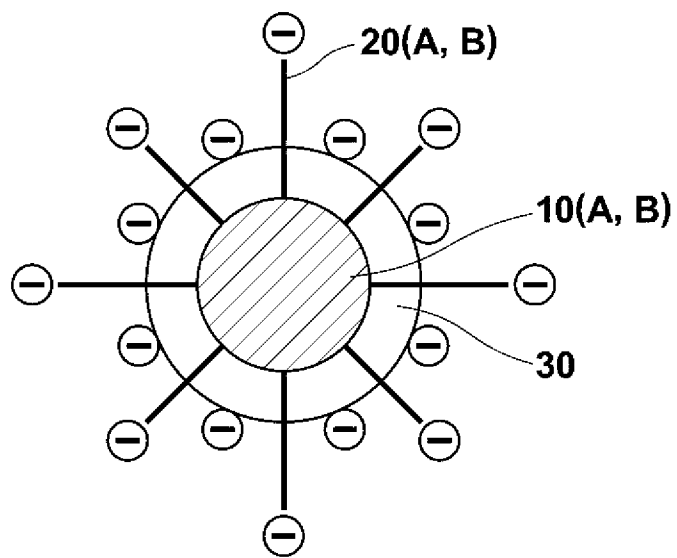
[図1B]



[図1C]

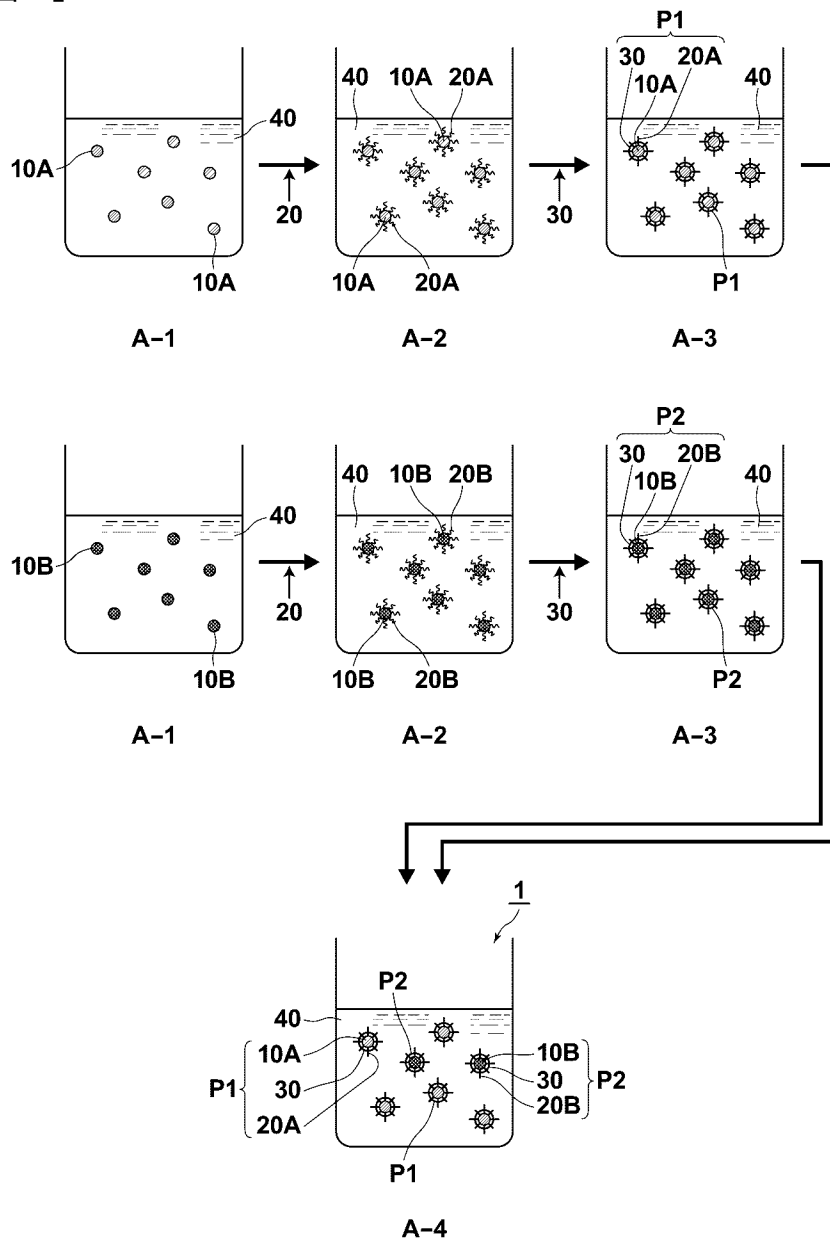


[図2A]

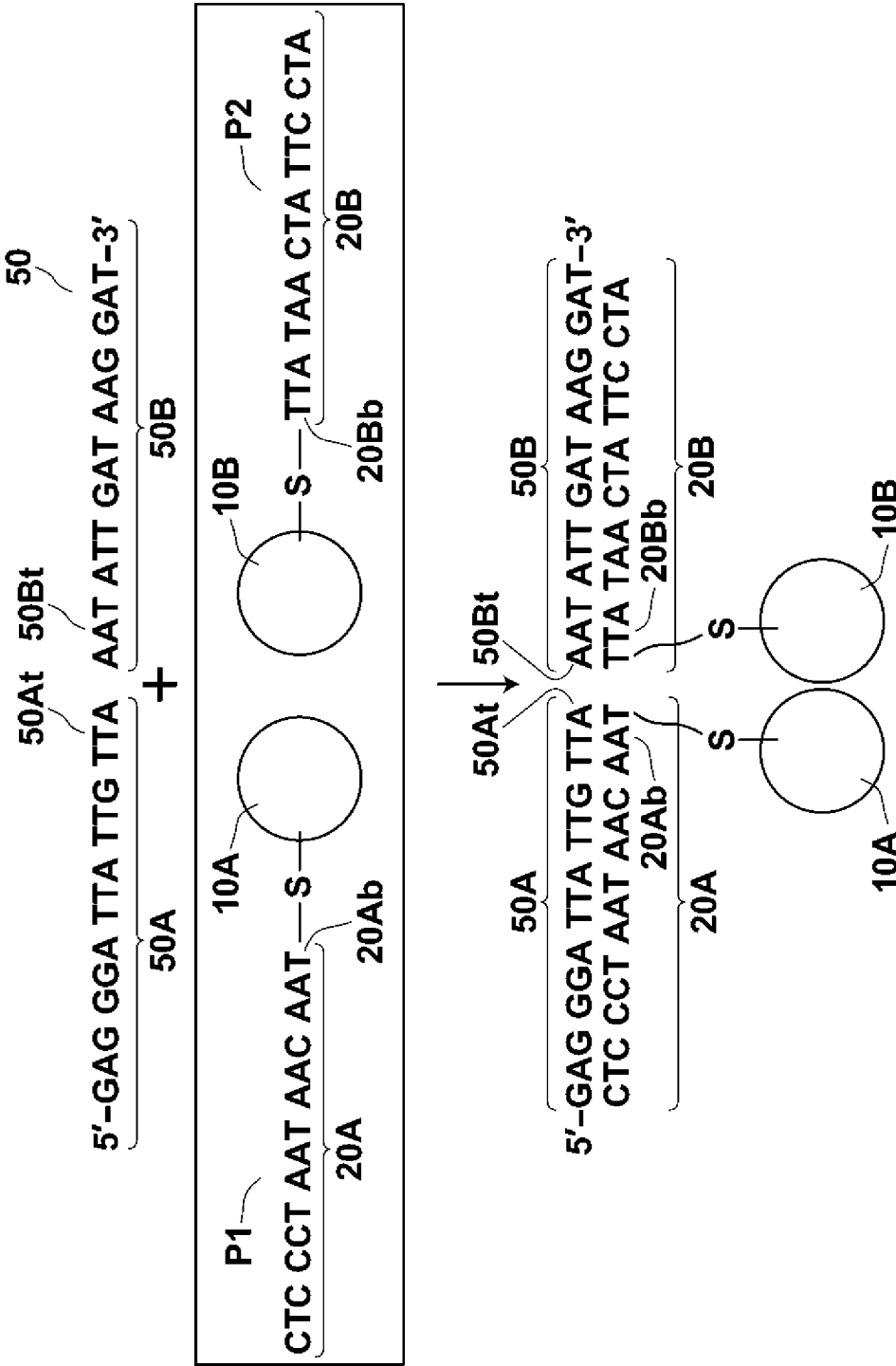


[illegible]

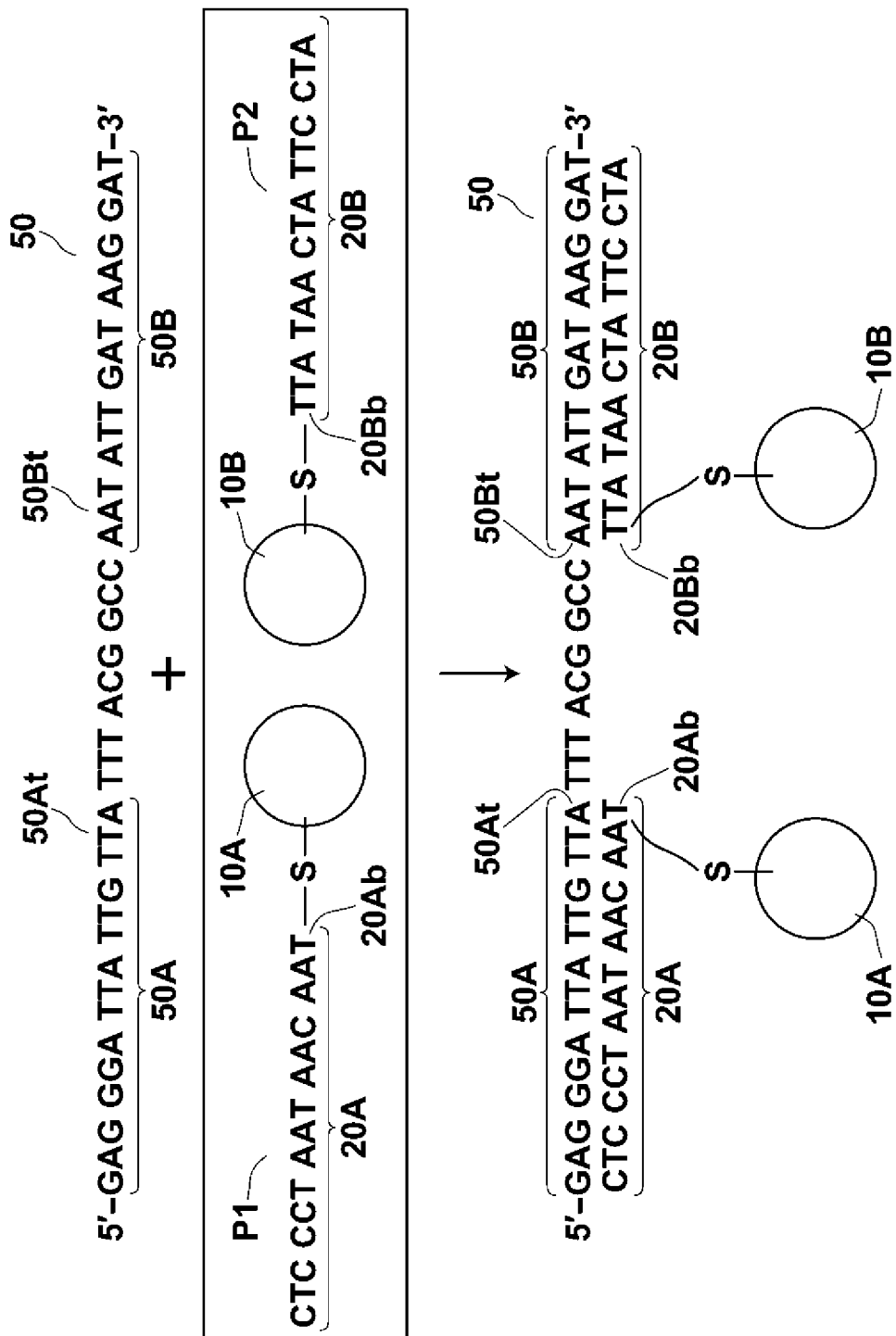
[図3A]



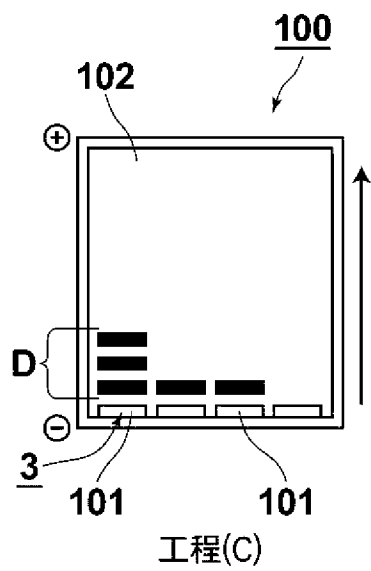
[図3B]



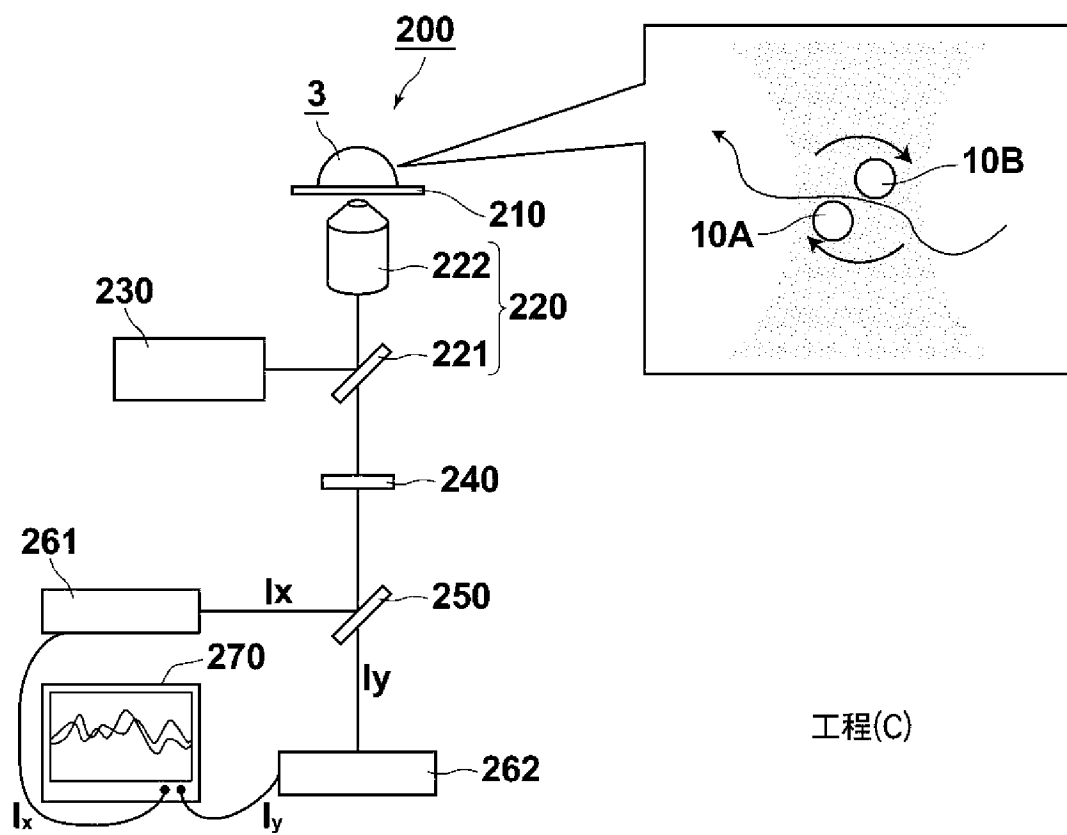
[図3C]



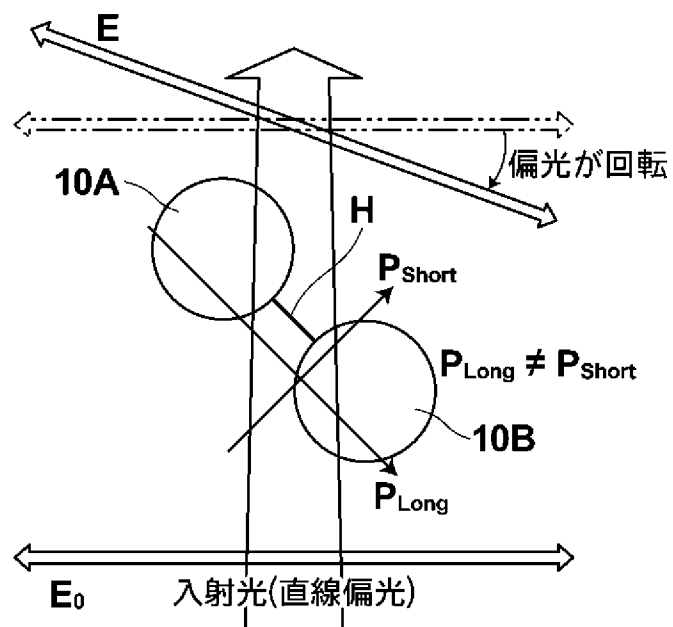
[図4A]



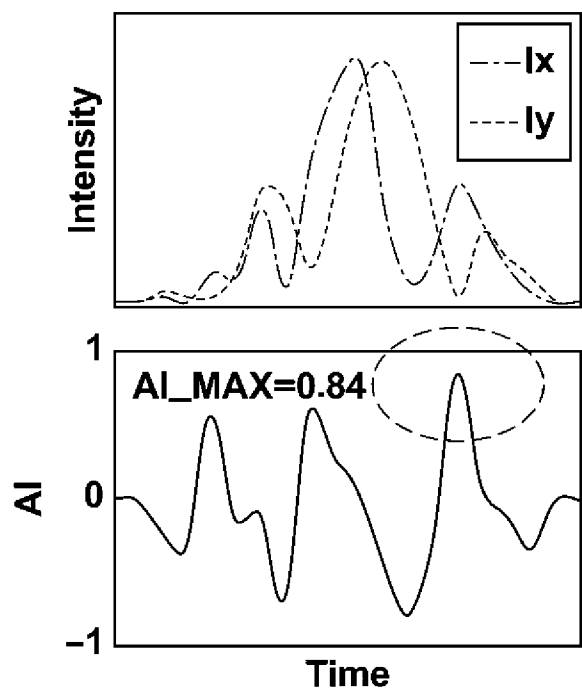
[図4B]



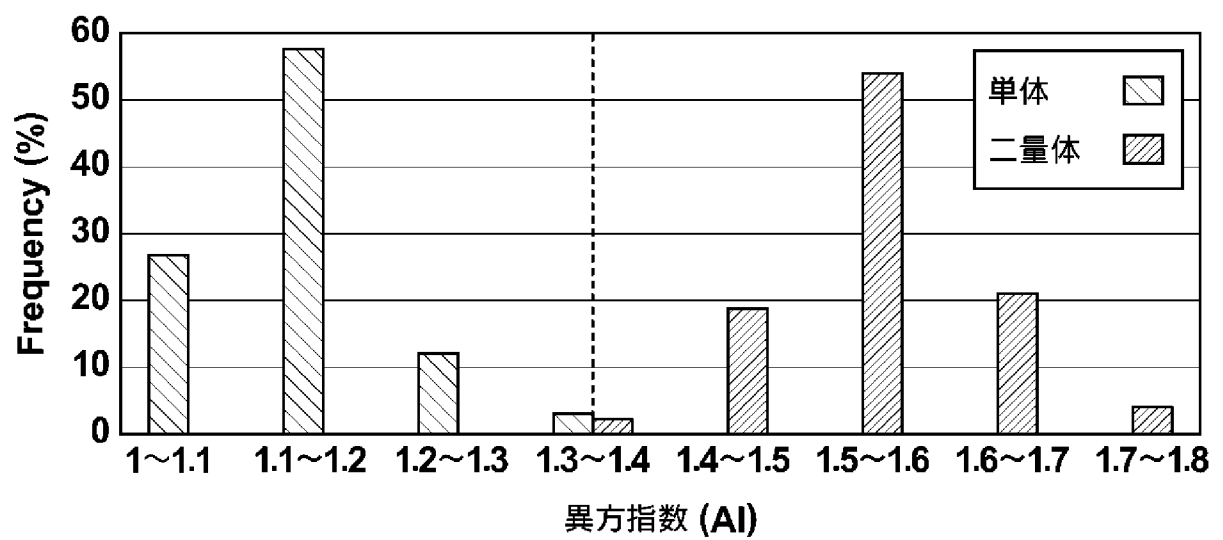
[図5]



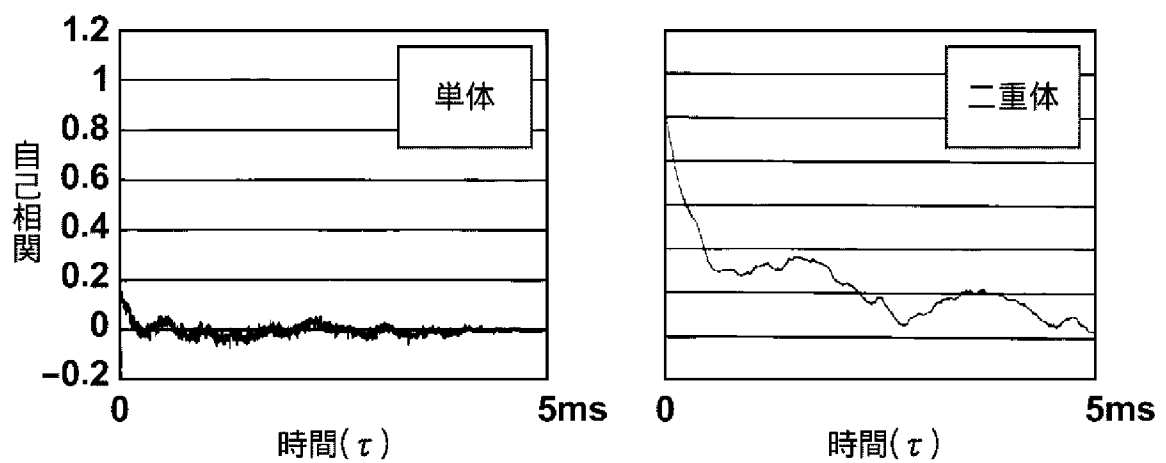
[図6]



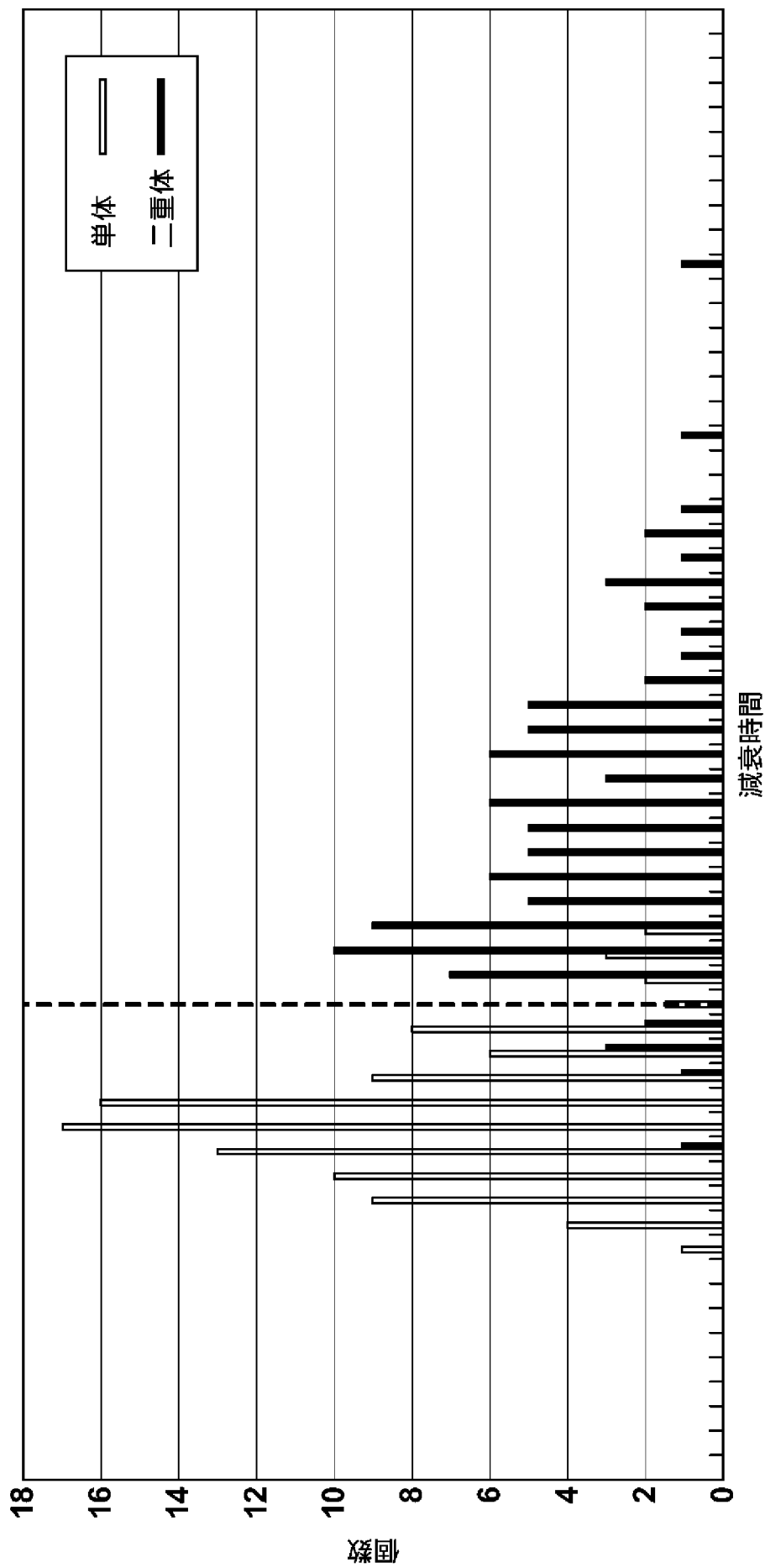
[図7]



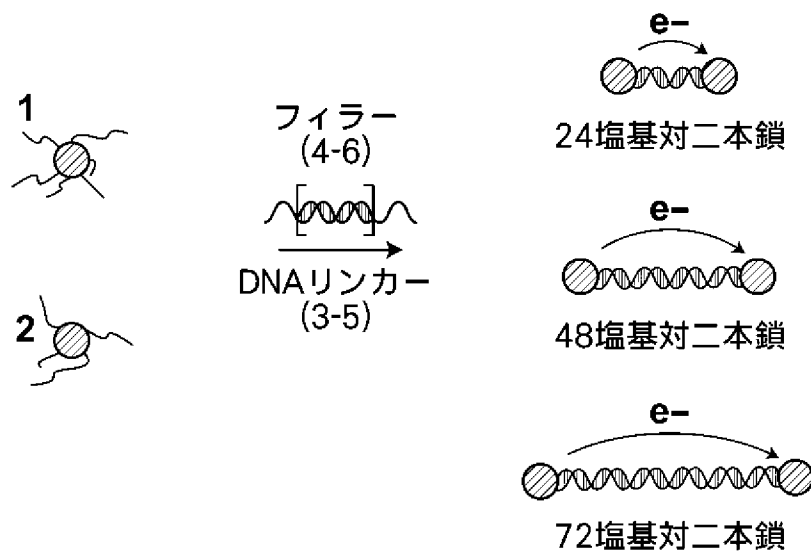
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N21/21(2006.01)i, G01N21/47(2006.01)i, G01N27/447(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12N15/09, G01N21/21, G01N21/47, G01N27/447, G01N33/53, G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	CHAK Chun-Pong et al., DNA hybridization of pathogenicity island of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis with discretely functionalized gold nanoparticles in organic solvent mixtures, RSC Advances, 2011, Vol.1, p.1342-1348	1, 2, 4, 9, 13, <u>14</u> 1-18
<u>X</u> <u>Y</u>	US 2010/0048424 A1 (KWOON Sunghoon), 25 February 2010 (25.02.2010), claims; paragraphs [0033], [0037]; fig. 1F (Family: none)	<u>1, 4, 9, 13, 14</u> 1-18
Y	JP 2004-069665 A (Shinji KATSURA), 04 March 2004 (04.03.2004), claims (Family: none)	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 June 2015 (26.06.15)

Date of mailing of the international search report
07 July 2015 (07.07.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002062

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-183910 A (Sekisui Medical Co., Ltd.), 26 August 2010 (26.08.2010), claims; paragraph [0013] (Family: none)	1-18
Y	JP 2000-352811 A (NEC Corp.), 19 December 2000 (19.12.2000), paragraph [0010] (Family: none)	1-18
A	JP 2005-525084 A (Nanosphere, Inc.), 25 August 2005 (25.08.2005), claims; fig. 17 & US 2003/0087242 A1 & WO 2003/035829 A2 & EP 1478774 A2	1-18
A	JP 2007-516843 A (The Regents of the University of California), 28 June 2007 (28.06.2007), claims; fig. 3 & US 2005/0176029 A1 & WO 2005/040755 A2 & EP 1678495 A2	1-18
A	KANG Taegyeong et al., Optimization of energy transfer between quantum dots and gold nanoparticles in head-to-head configuration for detection of fusion gene, Sensors and Actuators B, 2013, Vol.188, p.729-734	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N21/21(2006.01)i, G01N21/47(2006.01)i, G01N27/447(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09, G01N21/21, G01N21/47, G01N27/447, G01N33/53, G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X — Y	CHAK Chun-Pong et al., DNA hybridization of pathogenicity island of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis with discretely functionalized gold nanoparticles in organic solvent mixtures, RSC Advances, 2011, Vol.1, p.1342-1348	1, 2, 4, 9, 13, 14 1-18
X Y	US 2010/0048424 A1 (KWOON Sunghoon) 2010.02.25, [特許請求の範囲] [0033] [0037] [図 1F] (ファミリーなし)	1, 4, 9, 13, 14 1-18

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 6 . 0 6 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 7 . 0 7 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

原 大樹

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

5 2 7 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2004-069665 A (桂 進司) 2004. 03. 04, [特許請求の範囲] (ファミリーなし)	1-18
Y	JP 2010-183910 A (積水メディカル株式会社) 2010. 08. 26, [特許請求の範囲] [0013] (ファミリーなし)	1-18
Y	JP 2000-352811 A (日本電気株式会社) 2000. 12. 19, [0010] (ファミリーなし)	1-18
A	JP 2005-525084 A (ナノスフェア インコーポレイテッド) 2005. 08. 25, [特許請求の範囲] [図 17] & US 2003/0087242 A1 & WO 2003/035829 A2 & EP 1478774 A2	1-18
A	JP 2007-516843 A (ザ・レジエンツ・オブ・ザ・ユニバーシティ・ オブ・カリフォルニア) 2007. 06. 28, [特許請求の範囲] [図 3] & US 2005/0176029 A1 & WO 2005/040755 A2 & EP 1678495 A2	1-18
A	KANG Taegyeong et al., Optimization of energy transfer between quantum dots and gold nanoparticles in head-to-head configuration for detection of fusion gene, Sensors and Actuators B, 2013, Vol.188, p.729-734	1-18